

JP2001261656

Publication Title:

2-oxo-imidazolidine-4-carboxylic acid hydroxamine compounds that inhibit matrix metalloproteinases

Abstract:

The present invention relates to a compound of the formula <CHEM> wherein R<1>, R<2>, R<3> and R<4> are as defined above, and pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof, that are useful, for example, as matrix metalloproteinase inhibitors. The present invention is also directed to pharmaceutical compositions comprising such compounds and methods of treatment for diseases such as osteoarthritis, rheumatoid arthritis, cancer, osteoporosis, tissue ulceration, restinosis, periodontal disease, inflammation, epidermolysis bullosa, scleritis, stroke, Alzheimer's disease, and the like, characterized by inappropriate matrix metalloproteinase activity. Processes for the synthesis of compounds of formula (I) are also disclosed.

Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-261656
(P2001-261656A)

(43) 公開日 平成13年9月26日 (2001.9.26)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

データコード (参考)

C 0 7 D 233/32

C 0 7 D 233/32

A 6 1 K 31/4166

A 6 1 K 31/4166

31/4174

31/4174

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 1/00

1/02

1/02

審査請求 有 請求項の数19 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-43556(P2001-43556)

(22) 出願日 平成13年2月20日 (2001.2.20)

(31) 優先権主張番号 60/188892

(32) 優先日 平成12年3月13日 (2000.3.13)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 39706/152

ファイザー・プロダクツ・インク

アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市

イースタン・ポイント・ロード

(72) 発明者 エレン ルース ライアード

アメリカ合衆国 06340 コネチカット州

グロトン市 イースタン・ポイント・ロ

ード (番地なし) ファイザー・グロー

バル・リサーチ・アンド・デベロップメン

ト内

(74) 代理人 100092783

弁理士 小林 浩

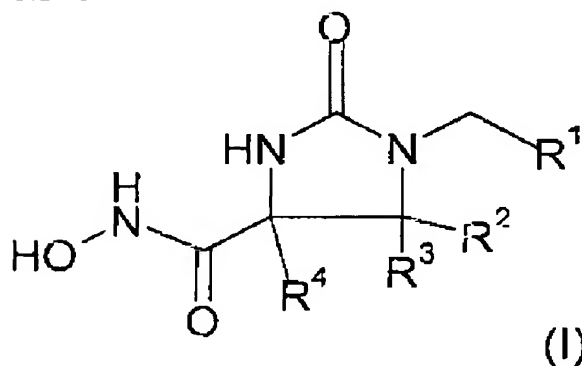
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マトリックスメタロプロテイナーゼを阻害する 2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキサミド化合物

(57) 【要約】

本発明は、式

【化1】



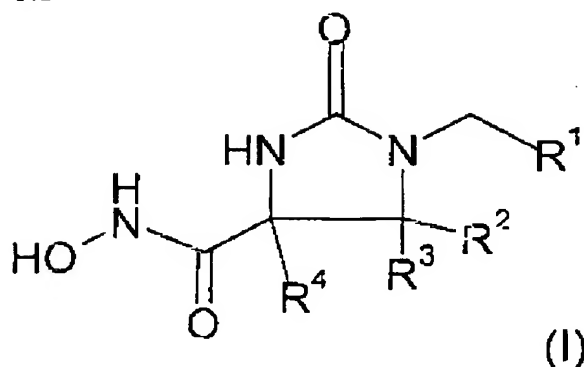
る変形性関節症、慢性関節リウマチ、癌、骨粗しょう症、組織腫瘍化、再狭窄、歯周病、炎症、表皮水疱症、胸膜症、脳卒中、アルツハイマー病などの疾患の治療方法に関する。式 (I) で表される化合物の合成方法についても開示する。

(式中、R¹、R²、R³ および R⁴ は上記で規定される通りである) の化合物、ならびにその薬学的に受容可能な塩および溶媒和物に関し、例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤として有用である。本発明はまた、このような化合物を含む薬学的組成物および不適切なマトリックスメタロプロテイナーゼ活性を特徴とす

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(1)

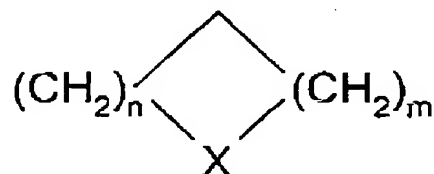
【化1】



(式中、 R^1 は、 $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリールオキシ $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリールオキシ $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリールオキシ $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリールオキシ $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリールオキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリールオキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_6)$ アルキル $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_6)$ アルキル $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_6)$ アルキル $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_6)$ アルキル $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_6)$ アルコキシ $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_6)$ アルコキシ $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_6)$ アルコキシ $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_6)$ アルコキシ $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリールオキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリールオキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル $(C_6 - C_{10})$ アリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリールオキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリールオキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリ

ール $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_6 - C_{10})$ アリール $(C_1 - C_6)$ アルコキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル、または $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール $(C_1 - C_6)$ アルコキシ $(C_1 - C_6)$ アルキルであり、ここで、独立して、さらなる結合を形成可能な前記 $(C_6 - C_{10})$ アリールおよび $(C_1 - C_9)$ ヘテロアリール部分の各環式炭素原子は、フッ素、塩素、臭素、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_6)$ アルコキシ、ならびにペルフルオロ $(C_1 - C_3)$ アルキル、およびペルフルオロ $(C_1 - C_3)$ アルコキシから選択される基により任意に置換され； R^2 および R^3 は、それぞれ独立して、水素および $(C_1 - C_6)$ アルキルから選択されるか、または共に式

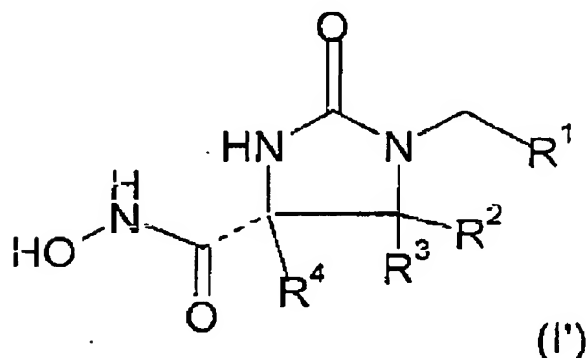
【化2】



のスピロ環の形態をとり、ここで、 X は結合、 CH_2 、 O 、 S 、 NH または N $(C_1 - C_6)$ アルキルであり、 n は独立して1または2であり、そして m は独立して1または2であり；そして R^4 は水素または $(C_1 - C_6)$ アルキルである）で表される化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

【請求項2】 式(I')

【化3】



で表される請求項1に記載の化合物。

【請求項3】 R^2 、 R^3 および R^4 は水素である、請求項1に記載の化合物。

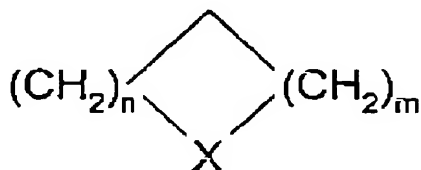
【請求項4】 R^4 は水素である、請求項1に記載の化合物。

【請求項5】 R^4 は $(C_1 - C_6)$ アルキルである、請求項1に記載の化合物。

【請求項6】 R^2 および R^3 は水素である、請求項1に記載の化合物。

【請求項7】 R^2 は R^3 に同一であるように R^2 および R^3 は ($C_1 - C_6$) アルキルである、請求項1に記載の化合物。

【請求項8】 R^2 および R^3 は共に式【化4】



のスピロ環の形態をとりここで、Xは結合、 CH_2 、O、S、NHまたはN ($C_1 - C_6$) アルキルであり、nは1または2であり、そしてnはmに同一であるようにmは1または2である、請求項1に記載の化合物。

【請求項9】 R^1 は4-(4-フルオロフェノキシ)フェニルである、請求項1に記載の化合物。

【請求項10】 R^1 は4-(4-クロロフェノキシ)フェニルである、請求項1に記載の化合物。

【請求項11】 R^1 は4-(ナフタレン-2-イルオキシ)フェニルである、請求項1に記載の化合物。

【請求項12】 (4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(ナフタレン-1-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(ナフタレン-2-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-(4-メトキシベンジル)-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[3-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-ナフタレン-2-イルメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-(4'-フルオロビフェニル-4-イルメチル)-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-(4-ベンジルオキシベンジル)-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；および

(4R)-1-[4-(2-クロロ-4-フルオロベンジルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミドから成る群より選択される請求項1に記載の化合物。

【請求項13】 (4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-7-オキサ-1,3-ジアザスピロ[4.4]ノナン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-2-オキソ-1-[4-(ピリジン-4-イルオキシ)ベンジル]イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-4-メチル-2-オキソ-1-[4-(ピリジン-4-イルオキシ)ベンジル]イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-5,5-ジメチル-2-オキソ-1-[4-(ピリジン-4-イルオキシ)ベンジル]イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-5,5-ジメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-5,5-ジメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-4-メチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-4-メチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-1,3-ジアザスピロ[4.4]ノナン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-1,3-ジアザスピロ[4.4]ノナン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-4,5,5-トリメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-4,5,5-トリメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-4-メチル-1-[4-(ナフタレン-2-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-5,5-ジメチル-1-[4-(ナフタレン-2-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(5-フルオロピリジン-2-イルオキシ)ベンジル]-4-メチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-2-オキソ-1-(4-ピリジン-4-イルベンジル)イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシ

アミドおよび

(4R)-2-オキソ-1-(4-ピリジルメチル)イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキサミドから成る群より選択される請求項1に記載の化合物。

【請求項14】 ヒトを含む哺乳動物における関節炎（変形性関節症および慢性関節リウマチを含む）、炎症性腸疾患、クローン病、気腫、慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病、臓器移植毒性、悪液質、アレルギー反応、炎症、アレルギー性接触過敏症、癌、組織腫瘍化、再狭窄、歯周病、表皮水疱症、骨粗しょう症、人工関節インプラントの弛み、アテローム性動脈硬化症（アテローム動脈硬化斑の破壊を含む）、大動脈瘤（腹大動脈瘤および脳大動脈瘤を含む）、うつ血性心不全、心筋梗塞、脳卒中、脳虚血、頭部外傷、脊髄損傷、神経変性異常（急性および慢性）、自己免疫異常、ハンチントン病、パーキンソン病、片頭痛、うつ病、末梢性ニューロパシー、痛み、脳のアミロイドアンギオパシー、精神向性または認知増強、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、眼血管新生、角膜損傷、黄斑変性、異常創傷治癒、火傷、糖尿病、腫瘍浸潤、腫瘍増殖、腫瘍転移、角膜瘻痕形成、強膜炎、エイズ、敗血症および敗血症性ショックから成る群より選択される状態の治療のための薬学的組成物であって、前記治療において有効な量の請求項1に記載の化合物、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項15】 ヒトを含む哺乳動物における関節炎（変形性関節症および慢性関節リウマチを含む）、炎症性腸疾患、クローン病、気腫、慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病、臓器移植毒性、悪液質、アレルギー反応、炎症、アレルギー性接触過敏症、癌、組織腫瘍化、再狭窄、歯周病、表皮水疱症、骨粗しょう症、人工関節インプラントの弛み、アテローム性動脈硬化症（アテローム動脈硬化斑の破壊を含む）、大動脈瘤（腹大動脈瘤および脳大動脈瘤を含む）、うつ血性心不全、心筋梗塞、脳卒中、脳虚血、頭部外傷、脊髄損傷、神経変性異常（急性および慢性）、自己免疫異常、ハンチントン病、パーキンソン病、片頭痛、うつ病、末梢性ニューロパシー、痛み、脳のアミロイドアンギオパシー、精神向性または認知増強、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、眼血管新生、角膜損傷、黄斑変性、異常創傷治癒、火傷、糖尿病、腫瘍浸潤、腫瘍増殖、腫瘍転移、角膜瘻痕形成、強膜炎、エイズ、敗血症および敗血症性ショックから成る群より選択される状態を治療するための方法であって、前記状態を治療するのに有効な量の請求項1に記載の化合物を前記哺乳動物に投与することを含む、方法。

【請求項16】 ヒトを含む哺乳動物におけるマトリックスメタロプロテイナーゼの阻害によって治療可能な状態の治療のための薬学的組成物であって、前記治療において有効な量の請求項1に記載の化合物および薬学的に

受容可能なキャリアを含む、上記薬学的組成物。

【請求項17】 ヒトを含む哺乳動物における哺乳動物レプロライシンの阻害によって治療可能な状態の治療のための薬学的組成物であって、前記治療において有効な量の請求項1に記載の化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項18】 ヒトを含む哺乳動物におけるマトリックスメタロプロテイナーゼを阻害する方法であって、有効な量の請求項1に記載の化合物を前記哺乳動物に投与することを含む、方法。

【請求項19】 ヒトを含む哺乳動物における哺乳動物レプロライシンを阻害する方法であって、有効な量の請求項1に記載の化合物を前記哺乳動物に投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキサミド誘導体、および前記誘導体を含む薬学的組成物、ならびに関節炎、炎症、癌および以下に記載の他の疾患の治療における前記誘導体の使用に関する。

【0002】本発明の化合物は、亜鉛メタロエンドペプチダーゼ、具体的には、マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMPまたはマトリキシンと呼ばれる）およびメトリジンシンのレプロライシン（アダミルシンとしても知られる）サブファミリー（Rawlingsら、Methods in Enzymology, 248, 183-228 (1995)およびStockerら、Protein Science 4, 823-840(1995)）に属する亜鉛メタロエンドペプチダーゼの阻害剤である。

【0003】酵素のMMPサブファミリーは、現在、17のメンバー（MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-17、MMP-18、MMP-19、MMP-20）を含有している。MMPについては、細胞外マトリックスタンパク質のターンオーバーを調節するそれらの役割が最もよく知られており、前記MMPは、生殖、発達および分化などの正常な生理学的プロセスにおいて重要な役割を果たす。さらに、該MMPは、異常結合組織のターンオーバーが生じる多くの生理学的状況で発現される。例えば、MMP-13はII型コラーゲン（軟骨中の主要コラーゲン）の分解時に強力な活性を呈する酵素であり、変形性関節症軟骨において過剰発現されることが明らかにされている（Mitchellら、J.Clin. Invest., 97, 761 (1996)）。他のMMP（MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-12）も変形性関節症軟骨において過剰発現されており、変形性関節症もしくは慢性関節リウマチなどの関節疾患に典型的な軟骨の加速的消失を遅延または阻止するために、これらのMMPのいくつかまたは全てを阻害することが期待される。

【0004】特定のメタロプロテイナーゼの過剰発現はまた、腫瘍細胞の転移にも関連する。前記活性は、健康

な組織の浸潤に必須であると考えられる。悪性細胞の伝播を制限するためには、これらのプロテイナーゼのいくつかまたは全ての活性を阻害することが期待される。さらに、血管新生に特定のメタロプロテイナーゼが必要であり、例えばそのプロセスによって、増殖中の腫瘍は、新たな血管形成によってさらなる血液の供給を得る。従って、腫瘍の増殖を遅延するまたは阻止するためには、これらの酵素を阻害することが期待される。

【0005】本発明の化合物はまた、正常および病因学的プロセスの両方において重要な役割を有するさらなるクラスの酵素を有用に阻害することが期待される。例えば、哺乳動物レプロライシンはADAMとして知られており（ジスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ）（Wolffbergら、J. Cell. Biol., 131, 275-278 (1995)）、メタロプロテイナーゼ様ドメインに加えてジスインテグリンドメインを含有する。現在までに、23の異なるADAMが同定されている。ADAM-17は腫瘍壊死因子 α 変換酵素（TACE）としても知られており、最もよく知られているADAMである。

【0006】ADAM-17（TACE）は、細胞結合腫瘍壊死因子 α （TNF- α 、カケクチンとしても知られる）の切断を担う。TNF- α は、多くの感染性および自己免疫疾患に関与することが認識されている（W. Friers, FEBS Letters, 285, 199 (1991)）。さらに、TNF- α は、敗血症および敗血症性ショックに見られる炎症性応答の主なメディエーターであることが明らかにされている（Spoonerら、Clinical Immunology and Immunopathology, 62 S11 (1992)）。TNF- α の2つの形態、相対的分子量26,000（26 kD）のII型膜タンパク質および特異的タンパク質切断によって細胞結合タンパク質から作製される可溶性17 kD型が存在する。可溶性17 kD型のTNF- α は細胞により放出され、TNF- α の有害な効果に関連する。この型のTNF- α はまた、合成部位から遠位の部位で作用可能である。従って、TACEの阻害剤は、可溶性TNF- α の形成を防止し、可溶性因子の有害な効果を防止する。

【0007】さらなる例において、アグリカナーゼ（aggrease）は、軟骨アグリカン（aggrecan）の分解に重要な酵素である。アグリカナーゼはADAMと考えられている。軟骨マトリックスからのアグリカンの消失は変形性関節症および慢性関節リウマチなどの関節疾患の進行に重要な因子であり、これらの疾患に罹患した組織での軟骨の消失を遅延または阻止するためにはアグリカナーゼの阻害が期待される。

【0008】病因学的状況での発現が明らかにされている他のADAMとしては、ADAM TS-1（Kunoら、J. Biol. Chem. 272, 556-562 (1997)）、ADAM 10、12および15（Wuら、Biochem. Biophys. Res. Comm., 235, 437-442, (1997)）が挙げられる。ADAMの発現、生理学的基礎および疾患との関連が明らかにされるにつれて、このクラスの酵素を阻害することの十分な重要性が理解されるであ

う。

【0009】本発明の化合物は、関節炎（変形性関節症および慢性関節リウマチを含む）、炎症性腸疾患、クローン病、気腫、急性呼吸切迫症候群、喘息、慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病、臓器移植毒性、悪液質、アレルギー反応、炎症、アレルギー性接触過敏症、癌（例えば、大腸癌、乳癌、肺癌および前立腺癌を含む固形腫瘍癌ならびに白血病およびリンパ腫を含む造血性悪性疾患）、組織腫瘍化、再狭窄、歯周病、表皮水疱症、骨粗しょう症、人工関節インプラントの弛み、アテローム性動脈硬化症（アテローム動脈硬化斑の破壊を含む）、大動脈瘤（腹大動脈瘤および脳大動脈瘤を含む）、うっ血性心不全、心筋梗塞、脳卒中、脳虚血、頭部外傷、脊髄損傷、神経変性異常（急性および慢性）、自己免疫異常、ハンチントン病、パーキンソン病、片頭痛、うつ病、末梢性ニューロパシー、痛み、脳のアミロイドアンギオパシー、精神向性または認知増強、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、眼血管新生、角膜損傷、黄斑変性、異常創傷治癒、火傷、糖尿病、腫瘍浸潤、腫瘍増殖、腫瘍転移、角膜瘢痕形成、強膜炎、エイズ、敗血症または敗血症性ショックの治療に有用である。

【0010】本発明の化合物はまた、MMPおよび/またはADAMの阻害により治療の有益性がもたらされる疾患（例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼまたはADAM発現を特徴とする疾患）の治療に有用である。

【0011】マトリックスメタロプロテイナーゼおよびレプロライシン阻害剤は、文献において周知である。具体的には、1994年7月13日に公開された欧州特許公開第606,046号は、特定のヘテロ環式MMP阻害剤について言及している。国際特許公開第W098/08825号および同第W098/08815号は両方とも1998年3月5日に公開され、特定の環式ヒドロキサム酸MMP阻害剤について言及している。1999年1月19日に発行された米国特許第5,861,510号は、MMP阻害剤として有用である環式アリールスルホニルアミノヒドロキサム酸について言及している。1998年8月13日に公開された国際特許公開第W098/34918号は、MMP阻害剤として有用である特定のジアルキル置換化合物を含む環式ヒドロキサム酸について言及している。

【0012】国際特許公開第W096/27583号および同第W098/07697号（それぞれ1996年3月7日および1998年2月26日公開）は、アリールスルホニルヒドロキサム酸について言及している。国際特許公開第W098/03516号（1998年1月29日公開）は、MMP活性を有するホスフィネートについて言及している。国際特許公開第98/33768号（1998年8月6日公開）は、N-非置換型アリールスルホニルアミノヒドロキサム酸について言及している。欧州特許公開第EP935,963号（1999年8月18日に公開）は、変形性関節症の治療のためのMMP-13の選択的阻害剤の使用について言及している。米国特許出願第09/290,022号、同第09/287,930号および同第09/287,508号（それ

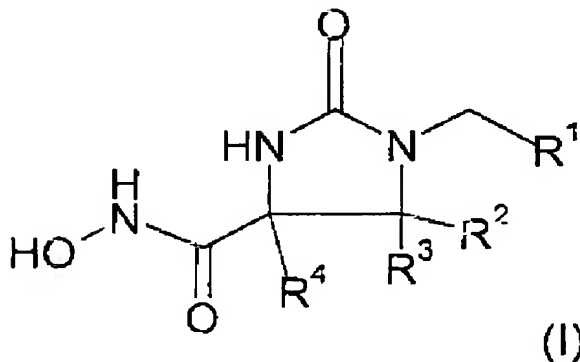
それ1999年4月9日、1999年4月7日および1999年4月7日出願)は、ヒドロキサム酸の調製方法について言及している。米国仮特許出願(題目「変形性関節症治療におけるアグリカナゼ(aggecanase)の選択的阻害剤」、1999年8月12日出願)は、MMPアグリカナゼおよびTACE阻害剤ならびにヒドロキサム酸のさらなる調製方法について言及している。米国非仮特許出願(題目「TACE阻害剤」、1999年8月12日出願)は、ヘテロ環式ヒドロキサム酸について言及している。上記の公開および出願物のそれぞれは、その全体が参考として本明細書に援用される。

【0013】病因学的状況が異なれば、発現されるMMPとADAMとの組み合わせも異なることが認められている。それ故、個々の疾患に対しては、個々のADAMおよび/またはMMPに特異的な選択性を有する阻害剤が好ましい。例えば、慢性関節リウマチは、過剰なTNFレベルおよび関節マトリックス成分の消失を特徴とする炎症性関節疾患である。この場合、TACEおよびアグリカナゼを阻害する化合物ならびにMMP-13などのMMPが好ましい治療である。対照的に、変形性関節症などのそれ程炎症性ではない関節疾患では、TACEではなく、MMP-13などのマトリックス分解性MMPを阻害する化合物が好ましい。

【0014】発明の概要

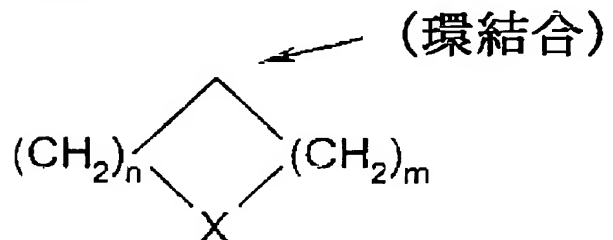
本発明は、式(1)

【化5】



(式中、R¹は、(C₆-C₁₀)アリール、(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₆-C₁₀)アリール(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₆)アルキル、(C₆-C₁₀)アリール(C₆-C₁₀)アリール、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₈-C₁₀)アリール、(C₆-C₁₀)アリール(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₆-C₁₀)アリールオキシ(C₆-C₁₀)アリール、(C₁-C₉)ヘテロアリールオキシ(C₆-C₁₀)アリール、(C₆-C₁₀)アリールオキシ(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₁-C₉)ヘテロアリールオキシ(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₆-C₁₀)アリールオキシ(C₁-C₆)アルキル、(C₁-

C₉)ヘテロアリールオキシ(C₁-C₆)アルキル、(C₆-C₁₀)アリール(C₁-C₆)アルキル(C₆-C₁₀)アリール、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₆)アルキル(C₆-C₁₀)アリール、(C₆-C₁₀)アリール(C₁-C₆)アルキル(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₆)アルキル(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₆-C₁₀)アリール(C₁-C₆)アルコキシ(C₆-C₁₀)アリール、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₆)アルコキシ(C₆-C₁₀)アリール、(C₆-C₁₀)アリール(C₁-C₆)アルコキシ(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₆)アルコキシ(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₆-C₁₀)アリールオキシ(C₁-C₆)アルキル(C₆-C₁₀)アリール、(C₁-C₉)ヘテロアリールオキシ(C₁-C₆)アルキル(C₆-C₁₀)アリール、(C₆-C₁₀)アリールオキシ(C₁-C₆)アルキル(C₁-C₉)ヘテロアリール、(C₁-C₉)ヘテロアリールオキシ(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₆-C₁₀)アリール(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₆-C₁₀)アリール(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₆)アルコキシ(C₁-C₆)アルキル、および(C₁-C₉)ヘテロアリール(C₁-C₆)アルコキシ(C₁-C₆)アルキルであり、ここで、独立して、さらなる結合を形成可能な前記(C₆-C₁₀)アリールおよび(C₁-C₉)ヘテロアリール部分の各環式炭素原子は、フッ素、塩素、臭素、(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₆)アルコキシ、ペルフルオロ(C₁-C₃)アルキル、およびペルフルオロ(C₁-C₃)アルコキシから選択される基により任意に置換され；R²およびR³は、それぞれ独立して、水素および(C₁-C₆)アルキルから選択されるか、または共に式【化6】



のスピロ環の形態をとり、ここで、Xは結合、CH₂、O、S、NHまたはN(C₁-C₆)アルキルであり、nは独立して1または2であり、そしてmは独立して1または2であり；そしてR⁴は水素または(C₁-

C₆) アルキルである) で表される化合物またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物に関する。

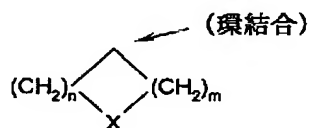
【0015】本発明の好ましい態様では、R¹ は、(C₆-C₁₀) アリール、(C₁-C₉) ヘテロアリール、(C₆-C₁₀) アリールオキシ(C₆-C₁₀) アリール、(C₁-C₉) ヘテロアリールオキシ(C₆-C₁₀) アリール、(C₆-C₁₀) アリール(C₆-C₁₀) アリール、(C₁-C₉) ヘテロアリール(C₆-C₁₀) アリール、(C₆-C₁₀) アリール(C₁-C₆) アルコキシ(C₆-C₁₀) アリールおよび(C₁-C₉) ヘテロアリール(C₁-C₆) アルコキシ(C₆-C₁₀) アリールから成る群より選択される。

【0016】本発明のさらなる好ましい態様では、R¹ は、(a) 4-[(C₆-C₁₀) アリール] フェニル、4-[(C₆-C₁₀) アリールオキシ] フェニルおよび4-[(C₆-C₁₀) アリール(C₁-C₆) アルコキシ] フェニルから；または(b) 4-[(C₁-C₉) ヘテロアリール] フェニル、4-[(C₁-C₉) ヘテロアリールオキシ] フェニルおよび4-[(C₁-C₉) ヘテロアリール(C₁-C₆) アルコキシ] フェニルから選択される。

【0017】非常に好ましい例としては、R¹ が4-(4-フルオロフェノキシ) フェニル、4-(4-クロロフェノキシ) フェニルおよび4-(ナフタレン-2-イルオキシ) フェニルである例が挙げられる。

【0018】本発明の好ましい態様では、R² およびR³ は、共に式

【化7】



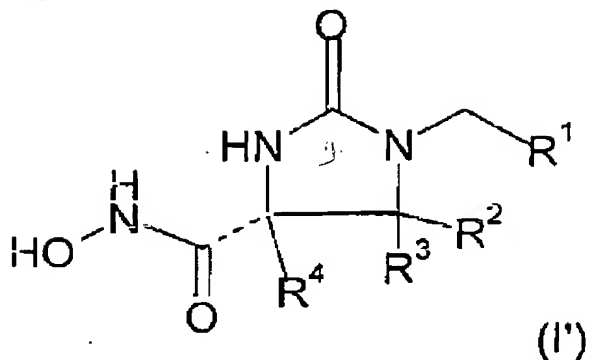
のスピロ環の形態をとり、ここで、Xは結合、CH₂、O、S、NHまたはN(C₁-C₆) アルキルであり、nは1または2であり、そしてnはmに同一であるようにmは1または2である。

【0019】本発明のさらなる好ましい態様では、R² およびR³ は、水素および(C₁-C₆) アルキルから選択される。本発明のこの態様によれば、R² はR³ と同じであり、即ちR² およびR³ は、R² がR³ と同じであるように、それぞれ水素であるか、またはそれぞれ(C₁-C₆) アルキルである。

【0020】本発明の好ましい態様では、R⁴ は(C₁-C₆) アルキルであり；R⁴ は水素であり；そしてR²、R³ およびR⁴ はそれぞれ水素である。

【0021】本発明の非常に好ましい実施態様では、R⁴ が結合する環式炭素はR配置である。従って、本発明の好ましい化合物は、式(I')

【化8】



(式中、R¹、R²、R³ およびR⁴ 基の選択は、R⁴ が結合する環式炭素原子で立体特異的配置が明記されていない化合物について上記に記載している通りである) で表される。

【0022】従って、本発明の好ましい化合物としては、(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(ナフタレン-1-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(ナフタレン-2-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-(4-メトキシベンジル)-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[3-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-ナフタレン-2-イルメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-(4'-フルオロビフェニル-4-イルメチル)-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-(4-ベンジルオキシベンジル)-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；および

(4R)-1-[4-(2-クロロ-4-フルオロベンジルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミドが挙げられる。

【0023】本発明のさらなる好ましい化合物としては、(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-7-オキサ-1,3-ジアザスピロ[4.4]ノナン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；

(4R)-2-オキソ-1-[4-(ピリジン-4-イルオキシ)ベンジル]イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-4-メチル-2-オキソ-1-[4-(ピリジン-4-イルオキシ)ベンジル]イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-5, 5-ジメチル-2-オキソ-1-[4-(ピリジン-4-イルオキシ)ベンジル]イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-5, 5-ジメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-5, 5-ジメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-4-メチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-4-メチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-1, 3-ジアザスピロ[4.4]ノナン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソ-1, 3-ジアザスピロ[4.4]ノナン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-4, 5, 5-トリメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(4-クロロフェノキシ)ベンジル]-4, 5, 5-トリメチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-4-メチル-1-[4-(ナフタレン-2-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-5, 5-ジメチル-1-[4-(ナフタレン-2-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-1-[4-(5-フルオロピリジン-2-イルオキシ)ベンジル]-4-メチル-2-オキソ-イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;

(4R)-2-オキソ-1-(4-ピリジン-4-イルベンジル)イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミドおよび

(4R)-2-オキソ-1-(4-ピリジルメチル)イミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミドが挙げられる。

【0024】本明細書で使用する用語「アルキル」は、他に指示されなければ、直鎖、分岐鎖または環式部分

またはそれらの組み合わせを有する一価の飽和炭化水素ラジカルを含む。

【0025】本明細書で使用する用語「アルコキシ」は、「アルキル」が上記のように規定されるO-アルキル基を含む。

【0026】本明細書で使用する用語「アリール」は、他に指示されなければ、1つの水素の除去によって単環式または二環式(C_6-C_{10})芳香族炭化水素から誘導される有機基(例えば、フェニルまたはナフチル)を含み、該有機基は、任意に、フルオロ、クロロ、ブロモ、パーフルオロ(C_1-C_6)アルキル(トリフルオロメチルを含む)、(C_1-C_6)アルコキシ、パーフルオロ(C_1-C_3)アルコキシ(トリフルオロメトキシおよびジフルオロメトキシを含む)および(C_1-C_6)アルキルから成る群より選択される置換基によって置換される。他に指示されなければ、それぞれの随意的置換基の選択は、他の任意の置換基の選択から独立し、好ましくは、置換基の数は0であるか、または1~3である。

【0027】本明細書で使用する用語「ヘテロアリール」は、他に指示されなければ、1つの水素の除去によって単環式または二環式(C_1-C_9)ヘテロ環式化合物から誘導される有機基(例えば、ピリジル、フリル、ピロイル、チエニル、イソチアゾリル、イミダゾリル、ベンゾイミダゾリル、テトラゾリル、ピラジニル、ピリミジル、キノリル、イソキノリル、ベンゾフリル、イソベンゾフリル、ベンゾチエニル、ピラゾリル、インドリル、イソインドリル、アリニル、カルバゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、ベンゾチアゾリルおよびベンゾオキサゾリル)を含み、該有機ラジカルは、任意に、フルオロ、クロロ、トリフルオロメチル、(C_1-C_6)アルコキシ、トリフルオロメトキシおよびジフルオロメトキシならびに(C_1-C_6)アルキルから成る群より選択される置換基によって置換される。他に指示されなければ、それぞれの任意の置換基の選択は、他の任意の置換基の選択から独立し、好ましくは、置換基の数は0であるか、または1~2である。

【0028】「適切な置換基」は、化学的および薬学的に受容可能な官能基(例えば、本発明の化合物の阻害活性を実質的に無効にしない部分および/または医薬としての本発明の化合物の製造、保存、もしくは使用に有用な特性に寄与する部分)を意味することが意図される。そのような適切な置換基は、当業者によって決定され得る。適切な置換基の例示的例として、アルキル基、水酸基、アルキルチオ基、アルコキシ基、カルボキシ基、アミノ基、アルキルおよびジアルキルアミノ基、カルバモイル基、アルキルカルボニル基、アルコキシカルボニル基、アルキルアミノカルボニル基、ジアルキルアミノカルボニル基、アリールカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニ

ル基などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0029】式Iで表される化合物は、キラル中心を有し、従って異なるエナンチオマー型で存在し得る。本発明は、式Iで表される化合物の全ての光学異性体、互変異性体および立体異性体およびそれらの混合物に関する。

【0030】本発明はまた、式Iで表される化合物の薬学的に受容可能な酸付加塩に関する。本発明の上記の塩基性化合物の薬学的に受容可能な酸付加塩を調製するのに使用される酸は、無毒性酸付加塩、即ち、薬学的に受容可能なアニオンを含む塩、例えば、塩酸塩、臭化水素塩、ヨウ化水素塩、硝酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、酒石酸水素塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、糖酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩およびパモ酸塩（即ち、1, 1'-メチレンビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート)塩)を形成する酸である。

【0031】本発明はまた、式Iで表される塩基性付加塩に関する。天然では酸性である式Iで表される化合物の薬学的に受容可能な塩基性塩を調製するために試薬として使用され得る化学的塩基は、前記化合物と無毒性塩基性塩を形成する塩基である。そのような無毒性塩基性塩としては、アルカリ金属カチオン（例えば、カリウムおよびナトリウム）およびアルカリ土類金属カチオン（例えば、カルシウムおよびマグネシウム）、アンモニウムまたはN-メチルグルカミン（メグルミン）などの水溶性アミン付加塩、および低級アルカノールアンモニウムならびに薬学的に受容可能な有機性アミンの他の塩基性塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【0032】本発明はまた、1以上の原子が、天然で通常見出される原子量または質量数とは異なる原子量または質量数を有する原子で置き換えられていることを除き、式Iで表される化合物に同一である放射性標識化合物を含む。本発明の化合物に取り込まれ得る放射性同位元素の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、リン、フッ素および塩素の同位体元素、例えば、それぞれ ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F および ^{36}Cl が挙げられる。上記の放射性同位元素および/または他の原子の他の放射性同位元素を含有する本発明の化合物、プロドラッグ、および前記化合物または前記プロドラッグの薬学的に受容可能な塩は本発明の範囲内にある。本発明の特定の放射性標識化合物、例えば、 ^3H および ^{14}C などの放射性同位元素を取り込む化合物は、薬物および/または基質組織分布アッセイに有用である。調製および検出可能性の容易性のためには、トリチウム化、即ち ^3H および炭素-14、即ち ^{14}C 放射性同位元素が特に好

ましい。さらに、重水素、即ち ^2H などのより重い放射性同位元素を有する置換基は、より高い代謝安定性（例えば、in vivoでの半減期が長い）または用量要件が少ない）から生じる特定の治療上の利点を呈し、このため、いくつかの環境で好ましくあり得る。本発明の式Iで表される放射性標識化合物およびそのプロドラッグは、一般に、下記のスキームおよび/または実施例および調製に開示される手順を行い、非放射性標識試薬の代わりに容易に利用可能な放射性標識試薬を使用することによって調製することができる。

【0033】本発明はまた、ヒトを含む哺乳動物における関節炎（変形性関節症および慢性関節リュウマチを含む）、炎症性腸疾患、クローン病、気腫、急性呼吸切迫症候群、喘息、慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病、臓器移植毒性、悪液質、アレルギー反応、アレルギー性接触過敏症、癌（例えば、大腸癌、乳癌、肺癌および前立腺癌を含む固形腫瘍癌ならびに白血病およびリンパ腫を含む造血性悪性疾患）、組織腫瘍化、再狭窄、歯周病、表皮水疱症、骨粗しょう症、人工関節インプラントの弛み、アテローム性動脈硬化症（アテローム動脈硬化斑の破壊を含む）、大動脈瘤（腹大動脈瘤および脳大動脈瘤を含む）、うっ血性心不全、心筋梗塞、脳卒中、脳虚血、頭部外傷、脊髄損傷、神経変性異常（急性および慢性）、自己免疫異常、ハンチントン病、パーキンソン病、片頭痛、うつ病、末梢性ニューロパシー、痛み、脳のアミロイドアンギオパシー、精神向性または認知増強、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、眼血管新生、角膜損傷、黄斑変性、異常創傷治癒、火傷、糖尿病、腫瘍浸潤、腫瘍増殖、腫瘍転移、角膜瘢痕形成、強膜炎、エイズ、敗血症および敗血症性ショックから成る群より選択される状態の治療のための薬学的組成物であって、前記治療において有効な量の式Iで表される化合物またはその薬学的に受容可能な塩、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、上記薬学的組成物に関する。

【0034】本発明はまた、メタロプロテイナーゼ活性（好ましくは、MMP-13）を特徴とする疾患およびヒトを含む哺乳動物における哺乳動物レプロライシン活性（好ましくはアグリカナーゼ活性、最も好ましくはアグリカナーゼ活性）を特徴とする他の疾患の治療のための薬学的組成物であって、前記治療において有効な量の式Iで表される化合物またはその薬学的に受容可能な塩、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、上記薬学的組成物に関する。

【0035】本発明はまた、(a)マトリックスメタロプロテイナーゼもしくはマトリックス分解に関与する他のメタロプロテイナーゼ、または(b)ヒトを含む哺乳動物における哺乳動物レプロライシン（例えば、アグリカナーゼ、もしくはADAM TS-1、10、12、15および17、最も好ましくはアグリカナーゼ）の阻害のための薬学的組成物であって、有効量の式Iで表される化合物または

その薬学的に受容可能な塩、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、上記薬学的組成物に関する。

【0036】本発明はまた、ヒトを含む哺乳動物における関節炎（変形性関節症および慢性関節リュウマチを含む）、炎症性腸疾患、クローン病、気腫、急性呼吸切迫症候群、喘息、慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病、臓器移植毒性、悪液質、アレルギー反応、アレルギー性接触過敏症、炎症、癌（例えば、大腸癌、乳癌、肺癌および前立腺癌を含む固形腫瘍癌ならびに白血病およびリンパ腫を含む造血性悪性疾患）、組織腫瘍化、再狭窄、歯周病、表皮水疱症、骨粗しょう症、人工関節インプラントの弛み、アテローム性動脈硬化症（アテローム動脈硬化斑の破壊を含む）、大動脈瘤（腹大動脈瘤および脳大動脈瘤を含む）、うつ血性心不全、心筋梗塞、脳卒中、脳虚血、頭部外傷、脊髄損傷、神経変性異常（急性および慢性）、自己免疫異常、ハンチントン病、パーキンソン病、片頭痛、うつ病、末梢性ニューロパシー、痛み、脳のアミロイドアンギオパシー、精神向性または認知増強、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、眼血管新生、角膜損傷、黄斑変性、異常創傷治療、火傷、糖尿病、腫瘍浸潤、腫瘍増殖、腫瘍転移、角膜瘢痕形成、強膜炎、エイズ、敗血症および敗血症性ショックから成る群より選択される状態を治療するための方法であって、前記状態を治療するのに有効な量の式 I で表される化合物またはその薬学的に受容可能な塩を前記哺乳動物に投与することを含む、上記方法に関する。

【0037】本発明はまた、マトリックスメタロプロテイナーゼ活性（好ましくは、MMP-13活性）を特徴とする疾患およびヒトを含む哺乳動物における哺乳動物レプロライシン活性（好ましくはアグリカナーゼ活性）を特徴とする他の疾患の治療であって、前記状態を治療するのに有効な量の式 I で表される化合物またはその薬学的に受容可能な塩を前記哺乳動物に投与することを含む、上記治療に関する。

【0038】本発明はまた、（a）マトリックスメタロプロテイナーゼもしくはマトリックス分解に関与する他のメタロプロテイナーゼ、または（b）ヒトを含む哺乳動物における哺乳動物レプロライシン（例えば、アグリカナーゼ、もしくはADAM TS-1、10、12、15および17、好ましくはアグリカナーゼ）を阻害するための方法であって、有効量の式 I で表される化合物またはその薬学的に受容可能な塩を前記哺乳動物に投与することを含む、上記方法に関する。

【0039】本発明はまた、哺乳動物の細胞膜からのTNF- α の切断を阻害するための方法であって、アグリカナーゼを阻害する有効量の式 I で表される化合物を前記哺乳動物に投与することを含む、上記方法に関する。

【0040】本発明はまた、哺乳動物の関節炎を治療するための方法であって、有効量のアグリカナーゼ阻害剤を前記哺乳動物に投与することを含む、ここで、前記ア

グリカナーゼ阻害剤は、MMP-1に優先してアグリカナーゼを選択的に阻害する、上記方法に関する。

【0041】本発明はまた、哺乳動物の関節炎を治療するための方法であって、有効量のアグリカナーゼ阻害剤を前記哺乳動物に投与することを含む、ここで、前記アグリカナーゼ阻害剤は、MMP-1の少なくとも10倍でアグリカナーゼを選択的に阻害する、上記方法に関する。

【0042】本発明はまた、哺乳動物の関節炎を治療するための方法であって、有効量のアグリカナーゼ阻害剤を前記哺乳動物に投与することを含む、ここで、前記アグリカナーゼ阻害剤は、MMP-1に優先してアグリカナーゼおよびMMP-13を選択的に阻害する、上記方法に関する。

【0043】本発明はまた、哺乳動物の関節炎を治療するための方法であって、有効量のアグリカナーゼ阻害剤を前記哺乳動物に投与することを含む、ここで、前記アグリカナーゼ阻害剤は、MMP-1の少なくとも10倍でアグリカナーゼおよびMMP-13を選択的に阻害する、上記方法に関する。

【0044】本発明はまた、哺乳動物の関節炎を治療するための方法であって、有効量のヒドロキサム酸アグリカナーゼ阻害剤を前記哺乳動物に投与することを含む、ここで、前記アグリカナーゼ阻害剤は、MMP-1に優先してアグリカナーゼおよびMMP-13を選択的に阻害する、上記方法に関する。

【0045】本発明はまた、哺乳動物の関節炎を治療するための方法であって、有効量のヒドロキサム酸アグリカナーゼ阻害剤を前記哺乳動物に投与することを含む、ここで、前記アグリカナーゼ阻害剤は、MMP-1の少なくとも10倍でアグリカナーゼおよびMMP-13を選択的に阻害する、上記方法に関する。

【0046】本明細書で使用する用語「治療する」は、前記用語を適用する異常もしくは状態、または前記異常もしくは状態の1つ以上の症状の進行を反転、軽減、阻害、あるいは予防することを指す。本明細書で使用する用語「治療」は、直ぐ上で規定した「治療する」の通り、治療する行為を指す。

【0047】本発明はまた、式 I で表される化合物のプロドラッグを含有する薬学的組成物を包含する。本発明はまた、マトリックスメタロプロテイナーゼの阻害もしくは哺乳動物レプロライシンの阻害によって治療または予防することができる異常を治療または予防する方法であって、式 I で表される化合物のプロドラッグを投与することを含む、上記方法を包含する。遊離のアミノ基、アミド基、水酸基またはカルボキシル基を有する式 I で表される化合物は、プロドラッグに変換することができる。プロドラッグは、アミノ酸残基または2個以上（例えば、2、3もしくは4）のアミノ酸残基のペプチド鎖が、ペプチド結合を介して式 I で表される化合物の遊離のアミノ基、水酸基またはカルボン酸基に共有結合する

化合物を含む。アミノ酸残基は、一般に3文字のシンボルで表される天然に存在する20個のアミノ酸を含み、また、4-ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリシン、デモシン、イソデモシン、3-メチルヒスチジン、ノルバリン、 β アラニン、 γ アミノ酪酸、シトルリン、ホモシステイン、ホモセリン、オルニチンおよびメチオニンスルホンを含む。プロドラッグはまた、炭酸塩、カルバミン酸塩、アミドおよびアルキルエステルが式Iで表される上記の置換基にカルボニル炭素のプロドラッグ側鎖を介して共有結合する化合物を含む。

【0048】当業者であれば、本発明の化合物が多様な列の疾患を治療するのに有用であることを理解するであろう。また、当業者であれば、特定の疾患の治療において本発明の化合物を使用する場合に、本発明の化合物は、該疾患に使用される様々な既存の治療薬と組み合わせてもよいことを理解するであろう。

【0049】慢性関節リウマチの治療のために、本発明の化合物を、TACE阻害剤などの薬剤、抗TNFモノクローナル抗体およびTNF受容体免疫グロブリン分子(Enbrel (登録商標)など)のTNF- α 阻害剤、COX-2阻害剤、低用量のメトトレキサート、レフニミド(lefunimide)、ヒドロキシクロキシン、d-ペニシラミン、オーラノフィン、または非経口もしくは経口金と組み合わせてもよい。

【0050】本発明の化合物はまた、変形性関節症の治療のための既存の治療薬と組み合わせ使用することができる。組み合わせ使用すべき適切な薬剤は、ピロキシカム、ジクロフェナク、プロピオン酸系薬剤(例えば、ナプロキセン、フルビプロフェン(flubiprofen)、フェノプロフェン、ケトプロフェンおよびイブプロフェン)、フェナム酸系薬剤(例えば、メフェナム酸)、インドメタシン、スリンダク、アパゾン、ピラゾロン系薬剤(例えば、フェニルブタゾン)、サリチル酸系薬剤(例えば、アスピリン)、COX-2阻害剤(例えば、セレコキシブ(celecoxib)およびレフェコキシブ)、鎮痛薬および関節間治療(例えば、コルチコステロイド)ならびにヒアルロン酸系薬剤(例えば、ヒアルガン(hyalgan)およびシンビスク(synvisc))などの

標準的な非ステロイド性抗炎症薬(以後、NSAID)を含む。

【0051】本発明の化合物はまた、エンドスタチン(endostatin)およびアンギオスタチン(angiostatin)または細胞障害性薬物(例えば、アドリアマイシン、ダウノマイシン、シスプラチン、エトポシド、タキソール、タキソテア(taxotere))およびアルカロイド(例えば、ビンクロステチン)ならびに代謝拮抗薬(例えば、メトトレキサート)などの抗癌剤と組み合わせて使用してもよい。

【0052】本発明の化合物はまた、カルシウムチャネル遮断薬、脂質降下剤(例えば、スタチン)、フィbrate、 β 遮断薬、Ace阻害剤、アンギオテンシン2受容体拮抗薬および血小板凝集阻害剤などの心血管薬剤と組み合わせて使用してもよい。

【0053】本発明の化合物はまた、抗うつ薬(例えば、セルトラリン)、抗パーキンソン症候群薬(例えば、デプレニル、レドーパ、レクイプ(requip)、ミラテクス(miratex)、MAOB阻害剤(例えば、セレジン(selegine)およびラザジリン(rasagiline))、comp阻害剤(例えば、Tasmar)、A-2阻害剤、ドーパミン再取り込み阻害剤、NMDA拮抗薬、ニコチン作動薬、ドーパミン作動薬ならびに神経の一酸化窒素シンターゼ阻害剤)、ならびに抗アルツハイマー薬(例えば、ドネペジル(donepezil)、タクリン、COX-2阻害剤、プロベントフィリン(propentofylline)またはメトリホネート(metryfonate))と組み合わせ使用してもよい。

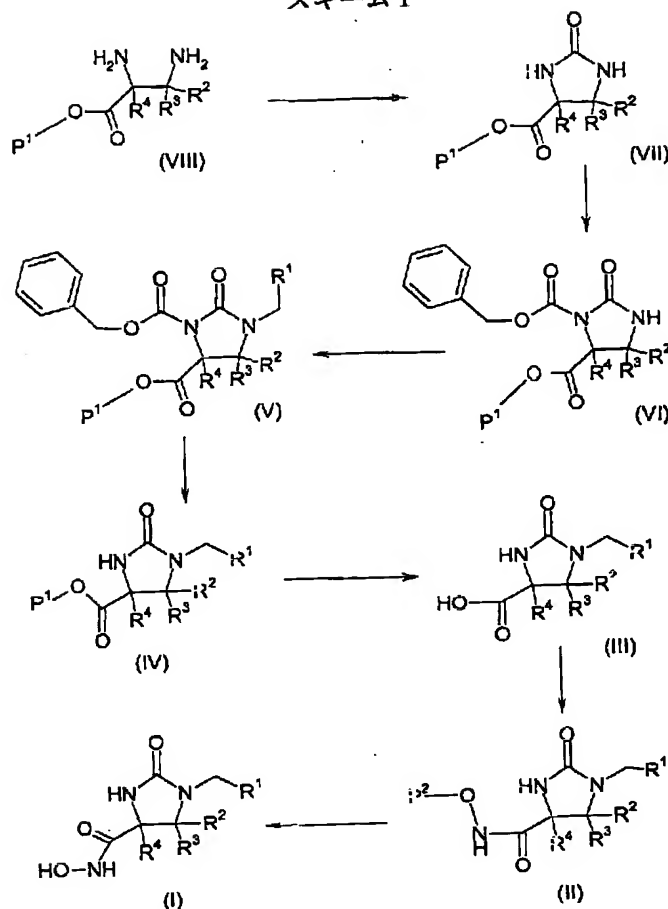
【0054】本発明の化合物はまた、骨粗しょう症薬剤(例えば、ロロキシフェン(roloxifene)、ドロロキシフェン(droloxifene)またはホソマックス(fosomax))および免疫抑制剤(例えば、FK506およびラパマイシン(rapamycin))と組み合わせ使用してもよい。

【0055】発明の詳細な説明

以下の反応スキームは、本発明の化合物の調製を例示している。他に指示されなければ、反応スキームのR¹、R²、ならびにR³およびR⁴ならびに以下の説明は、上記のように規定される。

【化9】

スキーム 1



【0056】一般反応条件

スキーム1を参照すれば、式Iで表される化合物は、ヒドロキシアミド保護基P²の除去により式IIで表される化合物から調製され、ここで、P²はtert-ブチル、ベンジル、2-トリメチルシリルエチルまたはアリルであり得る。好ましい保護基は2-トリメチルシリルエチルである。P²がベンジルである場合、ヒドロキシアミド保護基の除去は、メタノールなどの極性溶媒中硫酸バリウム上で触媒パラジウムを使用する水素化分解によって、約20℃の温度で行われる。P²が2-トリメチルシリルエチルである場合、ヒドロキシアミド保護基の除去は、塩化メチレンまたはクロロホルム、好ましくは塩化メチレンなどの不活性溶媒中で三フッ化ホウ素エテレートを使用して、約0℃～約50℃、好ましくは約20℃の温度で行われる。P³がtert-ブチルである場合、保護基の除去は、塩化メチレンまたはクロロホルム、好ましくは塩化メチレンなどの不活性溶媒中でトリフルオロ酢酸などの強酸を使用して、約0℃～約50℃、好ましくは約20℃の温度で実施される。P²がアリルである場合、保護基の除去は、触媒ビス(トリフェニルホスフィン)塩化パラジウム(II)の存在下で水素化トリブチルスズおよび酢酸で処理することにより行われ得る。

【0057】スキーム1を参照すれば、式IIで表される化合物は、塩化メチレンまたはN,N-ジメチルホルムアミド、好ましくは塩化メチレンなどの非プロトン性溶媒中、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドおよび1-ヒドロキシベンゾトリアゾールなどの活性化剤の存在下で、式P²ONH₂のヒドロキシルアミン誘導体との反応により、式IIIで表されるカルボン酸から調製され得る。反応は、約0℃～約50℃、好ましくは約20℃の温度で行われる。式P²ONH₂のヒドロキシルアミンは、好ましくは、トリエチルアミンまたはジイソプロピルエチルアミン、好ましくはジイソプロピルエチルアミンなどの塩基の存在下で、塩酸などの塩の形態からin situで作製される。

【0058】式IIIで表される化合物は、カルボン酸保護基P¹の除去によって、式IVで表される化合物から調製され得、ここで、P¹はメチル、エチルまたはtert-ブチル、好ましくはtert-ブチルである。P¹がメチルまたはエチルである場合、保護基P¹の除去は、水性エタノールなどのプロトン性溶媒中水酸化ナトリウムまたは水酸化リチウム、好ましくは水酸化リチウムなどの過剰の水酸化金属との反応によって、約0℃～約100℃、好ましくは約20℃の温度で行われる。IVの溶解度が制限

されている場合、共溶媒としてテトラヒドロフランを反応混合物に添加してもよい。P¹ がtert-ブチルである場合、保護基P¹ の除去は、塩化メチレンまたはクロロホルム、好ましくは塩化メチレンなどの不活性溶媒中で塩酸またはトリフルオロ酢酸、好ましくはトリフルオロ酢酸などの強酸との反応によって行われる。反応は、約0℃～約50℃、好ましくは約20℃の温度で行われる。

【0059】式IVで表される化合物は、反応不活性溶媒中、触媒の存在下、水素大気下での水素化により、式Vで表される化合物から調製され得る。適切な触媒は、炭素上パラジウム、炭素上水酸化パラジウムまたはパラジウム黒、好ましくは炭素上パラジウムを含む。適切な溶媒は、エタノール、またはメタノールなどのアルコール、好ましくはメタノールを含む。前記の反応は、約1～約5気圧、好ましくは約3気圧の圧力で実施される。前記反応の適切な温度は、約20℃（室温）～約60℃の範囲であり、好ましくは約20℃である。

【0060】式Vで表される化合物は、塩基および式R¹ (CH₂)_n-Xで表されるアルキル化剤との反応により、式VIで表される化合物から調製され得、ここで、Xは、Br、Iまたはパラートルエンスルホン酸などの脱離基である。適切な塩基は、炭酸カリウム、炭酸セシウム、ヘキサメチルジスラジトカリウム、または水素化ナトリウム、好ましくは炭酸カリウムを含む。反応物は、アセトン、N、N-ジメチルホルムアミド、またはN-メチルピロリジン-2-オンなどの極性溶媒中、約0℃～約50℃、好ましくは約20℃の温度で攪拌される。

【0061】式V（式中、R⁴ は（C₁-C₆）アルキルである）で表される化合物は、式V（R⁴ は水素である）で表される化合物のアルキル化を介して得ることができる。アルキル化は、式V（式中、R⁴ は水素である）で表される化合物の中間体と式CH₃ (CH₂)_n X（式中、nは0～5であり、Xはブromoまたはヨードである）で表されるハロゲン化アルキルとの反応により行われる。前記反応は、ジエチルエーテルまたはテトラヒドロフランなどの不活性溶媒中、リチウムジイソプロピルアミドまたはヘキサメチルジシラジドリチウムなどの干渉（hindered）強塩基の存在下、約-78℃～約0℃、好ましくは約-78℃で行われる。

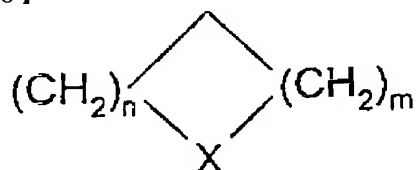
【0062】式VIで表される化合物は、トリエチルアミンまたはジイソプロピルエチルアミン、好ましくはトリエチルアミンおよび触媒量の4-ジメチルアミノピリジンの存在下、クロロギ酸ベンジルとの反応によって、式VIIで表される化合物から調製することができる。前記反応は、テトラヒドロフラン、塩化メチレンまたはクロロホルム、好ましくは塩化メチレンなどの溶媒中、約0℃～約20℃、好ましくは約20℃の温度で行われる。

【0063】式VIIで表される化合物は、ピリジンまたはトリエチルアミン、好ましくはトリエチルアミンなどの塩基の存在下、ホスゲン、カルボニルジイミダゾール

またはトリホスジン、好ましくはトリホスジンとの反応によって、式VIIIで表されるジアミノ化合物から調製することができる。前記反応は、テトラヒドロフラン、塩化メチレンまたはクロロホルム、好ましくはテトラヒドロフランなどの溶媒中、約0℃～約20℃、好ましくは約20℃の温度で行われる。

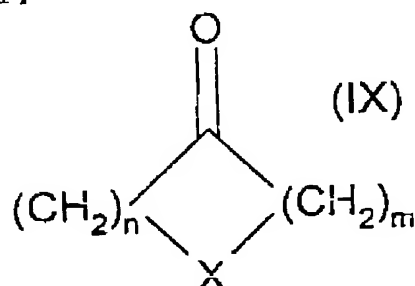
【0064】式VIII（式中、P¹ はメチルまたはエチルであり、R⁴ は水素であり、R² およびR³ は独立して（C₁-C₆）アルキルである）で表される化合物は、式R² R³ CO（式中、R² およびR³ は独立して（C₁-C₆）アルキルである）で表されるケトンから得ることができる。同様に、式VIII（式中、P¹ はメチルまたはエチルであり、R⁴ は水素であり、R² およびR³ は、共に式

【化10】



のスピロ環の形態をとり、ここで、Xは結合、CH₂、O、S、NHまたはN（C₁-C₆）アルキルであり、nは独立して1または2であり、そしてmは独立して1または2である）で表される化合物は、式（IX）（式中、Xは結合、CH₂、O、S、NHまたはN（C₁-C₆）アルキルであり、nは独立して1または2であり、そしてmは独立して1または2である）で表される環式ケトンから調製することができる。

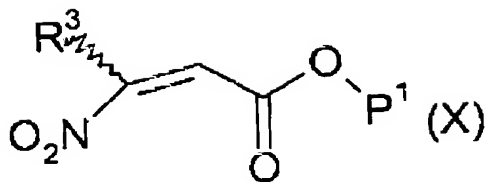
【化11】



【0065】方法は、R² およびR³ がメチルである場合のSchollkopfらにより記載の方法（Liebigs Ann. Chem. 1973, 611およびLiebigs Ann. Chem. 1977, 1183）と同一である。

【0066】式VIII（式中、P¹ はメチルまたはエチルであり、R³ およびR⁴ は水素である）で表される化合物は、式X：

【化12】



(式中、 R^3 は ($C_1 - C_6$) アルキルである) で表される化合物から調製され得る。この方法は、 R^3 がイソプロピルである場合のMohanらにより記載の方法 (J. Med. Chem. 1991, 34, 2402) と同一である。式IXで表される化合物を調製するためのいくつかの方法は、文献、例えば、Shinら、Bull. Chem. Soc. Jpn. 1972, 45, 3595において既知である。

【0067】式VI (P^1 はtert-ブチルであり、 R^2 、 R^3 および R^4 は水素である) で表される化合物は、Sエナンチオマーとして文献 (Shibaら、Bull. Chem. Soc. Japan, 1968, 41, 2748) において既知である。対応するRエナンチオマーは、出発物質としてN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギンの代わりにN-ベンジルオキシカルボニル-D-アスパラギンを使用し、Sエナンチオマーについて記載の通りに調製される。

【0068】天然では塩基性である式Iの化合物は、様々な無機および有機酸と広範な異なる塩を形成可能である。前記塩は動物への投与のために薬学的に受容可能でなければならないが、実際にはしばしば、はじめに薬学的に受容可能でない塩として式Iで表される化合物を反応混合物から単離し、次いでアルカリ試薬で処理することにより後者を遊離の塩基に変換して戻し、続いて、遊離の塩基を薬学的に受容可能な酸付加塩に変換することが所望される。本発明の塩基性化合物の酸付加塩は、水性溶媒媒体またはメタノールもしくはエタノールなどの適切な有機溶媒において実質的に等価量の選択された鉱酸あるいは有機酸で塩基性化合物を処理することによって容易に調製される。溶媒を注意深くエバポレーションさせると、所望の固体塩が得られる。

【0069】本発明の塩基性化合物の薬学的に受容可能な酸付加塩を調製するために使用される酸は、無毒性酸付加塩、即ち、塩酸、臭化水素塩、ヨウ化水素塩、硝酸塩、硫酸塩または硫酸水素塩、リン酸塩または酸性リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩または酸性クエン酸塩、酒石酸塩または酒石酸水素塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、糖酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩およびパモ酸塩 (即ち、1, 1'-メチレンビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート) 塩) などの薬学的に受容可能なアニオンを含有する塩を形成する酸である。

【0070】天然では酸性でもある式Iで表されるそれらの化合物は、様々な薬学的に受容可能なカチオンと塩基性塩を形成可能である。そのような塩の例としては、

アルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、特にナトリウムおよびカリウム塩が挙げられる。これらの塩は全て、従来の技法によって調製される。本発明の薬学的に受容可能な塩基性塩を調製するための試薬として使用される化学的塩基は、式Iで表される本明細書に記載の酸性化合物と無毒性塩基性塩を形成する塩基である。これらの無毒性塩基性塩は、ナトリウム、カリウム、カルシウムおよびマグネシウムなどのような薬学的に受容可能なカチオンから誘導される塩を含む。これらの塩は、対応する酸性化合物を、所望の薬学的に受容可能なカチオンを含有する水溶液で処理し、次いで、好ましくは減圧下で、得られる溶液をエバポレートして乾燥物にすることにより容易に調製できる。あるいは、酸性化合物の低級アルカノール溶液と所望のアルカリ金属アルコキシドとを共に混合し、次いで、上記と同様の様式で得られる溶液をエバポレートして乾燥物にすることにより調製してもよい。いずれの場合においても、好ましくは、反応物の完全性を確実にし、生成収量を最大にするために、試薬の化学量論的定量を用いる。

【0071】マトリックスメタロプロテインナーゼの阻害、腫瘍壊死因子 (TNF) の産生の阻害、および例えば、哺乳動物レプロライシンの阻害 (好ましくはアグリカナーゼの阻害) を目的とするヒトを含む哺乳動物への投与のために、経口、非経口 (例えば、静脈内、筋肉内または皮下)、口、肛門および局所を含む様々な従来の経路を使用することができる。一般に、本発明の化合物 (以後、活性化合物としても知られる) は、1日あたり0.1~25 mg/kg (投与しようとする被験体の体重)、好ましくは、約0.3~5 mg/kgの用量で投与され得る。好ましくは、活性化合物は経口または非経口で投与される。しかし、治療している被験体の状態に依存して用量を変動する必要もあるであろう。いずれにせよ、投与の責任者は、個々の被験体に適切な用量を決定し得る。

【0072】本発明の化合物は、広範な異なる用量形態で投与することができ、一般に、本発明の治療上有効な化合物は、約5.0重量%~約70重量%の範囲の濃度レベルの上記の剤形で存在する。

【0073】経口投与では、ミクロクリスタリンセルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸二カルシウムおよびグリシンなどの様々な賦形剤を含有する錠剤を、澱粉 (好ましくは、トウモロコシ、ポテトまたはタピオカ澱粉)、アルギン酸および特定の複雑なケイ酸塩などの様々な崩壊剤、ポリビニルピロリドン、シヨ糖、ゼラチンおよびアラビアガムのような粒状結合剤と共に用いてもよい。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクなどの潤滑剤は、錠剤化の目的にしばしば極めて有用である。ゼラチンカプセルの充填剤として類似のタイプの固体組成物を用いてもよい。これに関連する好ましい材料はまた、ラクトースまたは乳糖および高分子量のポリエチレングリ

コールを含む。水性懸濁剤および／またはエリキシル剤が経口投与のために所望される場合、有効成分を様々な甘味料または香料、着色料または染料、および所望であれば、乳化剤および／または懸濁化剤をも、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリンおよびそれらの様々な組み合わせと共に組み合わせてもよい。動物の場合、それらは動物の飼料または飲料水に、5～5000 ppm、好ましくは25～500 ppmの濃度で有利に含有される。

【0074】非経口投与（筋肉内、腹腔内、皮下および静脈内用途）では、通常、有効成分の滅菌注射用溶液が調製される。本発明の治療化合物の溶液は、ゴマ油あるいは落花生油または水性プロピレングリコール溶液中で使用し得る。水溶液は、適切に調整され、必要であれば好ましくは8を超えるpHで緩衝化され、液体希釈物は最初に等張にされる。これらの水性溶液は静脈内への注射目的に適切である。油性溶液は、関節内、筋肉内および皮下注射目的に適切である。滅菌条件下においてこれらのすべての溶液を調製することは、当業者に周知の標準的な薬学的技法により容易に達成される。動物の場合、化合物は、約0.1～50 mg/kg/日、有利には0.2～10 mg/kg/日の用量レベルで、筋肉内または皮下に単回もしくは3分割までで投与することができる。

【0075】本発明の活性化合物は、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の座薬基剤を含有する座剤または滞留浣腸などの直腸用組成物中に処方することもできる。

【0076】鼻腔内投与または吸入による投与では、本発明の活性化合物は、患者による締め付けもしくは汲み上げられるポンプスプレー容器からの溶液または懸濁液の形態で、あるいは適切なプロペラント、例えば、ジクロロフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体の使用を伴う圧縮された容器もしくは噴霧器からのエアゾルスプレー提示として簡便に送達される。圧縮されたエアゾルの場合、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって、用量単位を決定してもよい。圧縮された容器または噴霧器は、活性化合物の溶液または懸濁液を含有してもよい。吸入器または吹き入れ器における用途のために、本発明の化合物とラクトースもしくは澱粉などの適切な散剤基剤との散剤混合物を含有するカプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチンから作製される）を処方してもよい。

【0077】式Iで表される化合物またはそれらの薬学的に受容可能な塩（以後、本発明の化合物と呼ぶ）がメタロプロテイナーゼまたは哺乳動物レプロライシンを阻害し、従ってメタロプロテイナーゼまたは腫瘍壊死因子の産生を特徴とする疾患を治療するための有効性を実証する能力は、以下のin vitroアッセイ試験によって明らかにされる。

【0078】生物学的アッセイ

可溶性TNF産生の阻害

化合物またはその薬学的に受容可能な塩がTNFの細胞産生／放出を阻害し、従ってTNFの異常調節に関与する疾患を治療するための有効性を実証する能力は、以下のin vitroアッセイによって明らかにされる。

【0079】組換えTNF α 変換酵素活性の評価方法

1) 組換えTACEの調製

TACE（アミノ酸1～473）のシグナル配列、プロドメインおよび触媒ドメインをコードするDNAフラグメントを、テンプレートとしてヒト肺cDNAライブラリーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅した。増幅したフラグメントをpFastBacベクターにクローン化した。挿入物のDNA配列を両鎖について確認した。E. coli DH10-Bac中のpFastBacを使用して調製されたバクミド（bacmid）を、SF9昆虫細胞にトランスフェクトした。ウイルス粒子をP1、P2、P3期まで増幅した。P3ウイルスをSF9およびHigh Five昆虫細胞の両方に感染させ、27°Cで48時間増殖させた。培地を回収し、アッセイおよびさらなる精製に使用した。

【0080】2) 蛍光消光基質の調製

モデルペプチドTNF- α 基質（LY-ロイシンアラニングルタミンアラニンバリニン-アルギニンセリン-セリンリジン（CMTR）-アルギニン（LY=ルシファーイエロー；CMTR=5-カルボキシテトラメチルローダミン））を調製し、Geoghegan, KF, 「非修飾ペプチドをプロテイナーゼに対するエネルギー転移基質に変換するための方法の改良」Bioconjugate Chem. 7, 385-391 (1995)の方法に従って、560 nm (E_{560} 、60,000 M⁻¹cm⁻¹)の吸光度により濃度を見積もった。このペプチドは、TACEによりin vivoで切断されるプロTNF上に切断部位を包含する。

【0081】3) 酵素反応

96ウェルプレート（Dynatech）において行われた反応は、70 μ lの緩衝液（25mM Hepes-HCl、pH7.5+20 μ M ZnCl₂）、10 μ lの100 μ M蛍光消光基質、10 μ lの試験化合物のDMSO（5%）溶液、および60分間で50%切断を引き起こす α TACE酵素（総容量：100 μ l）から成った。アラニンとバリニンとの間のアミド結合に対する酵素切断の特異性を、HPLCおよび質量分析によって確認した。530 nmでの蛍光（409 nmにて励起）の増加速度を30分間測定することによって、切断の初期速度をモニターした。実験では、以下の項目について照らし合わせた：1) 基質のバックグラウンド蛍光；2) 十分に切断された基質の蛍光；3) 試験化合物を含有する溶液の蛍光消失または増加。

【0082】データを以下のように解析した。試験化合物非含有「対照」反応の速度を平均して、100%値を設定した。試験化合物存在下での反応速度を、化合物非存在下での速度と比較し、「試験化合物非含有対照の%」

として作表した。結果を「対照の%」対化合物濃度の対数としてプロットし、最大値の半分または IC_{50} 値を決定した。上記のアッセイに対する IC_{50} は、TACEのTNF- α タンパク質分解活性の阻害の測定値である。本明細書で使用するTACEに対するTNF- α の結合の阻止については、米国特許第5,830,742号(1998年11月3日発行)に記載されている。

【0083】単球アッセイ

1ステップFicoll-hypaque分離技法を使用して、抗凝固ヒト血液からヒト単核細胞を単離した。(2)単核細胞を、二価のカチオンを有するハanks液(HBSS)で3回洗浄し、再懸濁して、1%BSA含有HBSS中 2×10^6 /mlの密度にした。Abbott Cell Dyn 3500アナライザーを使用して決定した示差(differential)計数は、これらの集団の全細胞のうち、単球は17~24%の範囲であることを示した。

【0084】180 mlの細胞懸濁液を平底96ウェルプレート(Costar)に均等に入れた。化合物およびLPS(最終濃度: 100 ng/ml)を添加して、最終容量を200 μ lとした。全ての条件を3連で実施した。加湿 CO_2 インキュベーター中、37°Cで4時間インキュベート後、プレートを取り出し、遠心分離(約250 \times gで10分間)し、上清を取り出し、R&D ELISAキットを使用して、TNF- α についてアッセイした。

【0085】MMPアッセイ

本明細書で使用するコラゲナーゼ-3(マトリックスメタロプロテイナーゼ-13)選択的阻害剤は、コラゲナーゼ-3酵素活性の阻害に対する選択性がコラゲナーゼ-1酵素活性より少なくとも100倍であり、以下に記載のMMP-13/MMP-1蛍光アッセイによる IC_{50} の結果により規定されるように、100 nM未満の効力を示す薬剤である。コラゲナーゼ-3選択的阻害剤は、以下に記載のMMP-13/MMP-1蛍光アッセイを介して本発明の阻害剤をスクリーニングし、100以上のMMP-13/MMP-1阻害 IC_{50} 比および100 nM未満の効力を有する薬剤を選択することによって同定することができる。

【0086】本明細書で使用する非選択的コラゲナーゼ阻害剤は、コラゲナーゼ-3酵素活性の阻害に対する選択性がコラゲナーゼ-1酵素活性の100倍未満であり、以下に記載のMMP-13/MMP-1蛍光アッセイによる IC_{50} の結果により規定されるように、100 nMを超える効力を示す薬剤である。

【0087】コラゲナーゼ阻害剤がコラゲナーゼ活性を阻害する能力については、当該分野において周知である。以下のアッセイを使用して、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤を同定してもよい。

【0088】ヒトコラゲナーゼ(MMP-1)の阻害
ヒト組織換えコラゲナーゼは、以下の比率: 100 μ gのコラゲナーゼあたり10 μ gトリプシンを使用してトリプシンにより活性化する。トリプシンおよびコラゲナーゼを室

温で10分間インキュベートし、次いで、5倍過剰(50 μ g/10 μ gトリプシン)のダイズトリプシン阻害剤を添加する。

【0089】阻害剤の10 mMストック溶液をジメチルスルホキシドで作製し、次いで、以下のスキームを使用して希釈する。

10 mM \rightarrow 120 μ M \rightarrow 12 μ M \rightarrow 1.2 μ M \rightarrow 0.12 μ M

【0090】次いで、25 μ lの各濃度を、3連で96ウェル微蛍光プレートの適切なウェルに添加する。酵素および基質添加後の阻害剤の最終濃度は1:4希釈である。ポジティブコントロール(酵素あり、阻害剤なし)をウェルD1~D6に設定し、ブランク(酵素なし、阻害剤なし)をウェルD7~D12に設定する。

【0091】コラゲナーゼを400 ng/mlに希釈し、次いで25 μ lを微蛍光プレートの適切なウェルに添加する。アッセイ時のコラゲナーゼの最終濃度は100 ng/mlである。

【0092】基質(DNP-Pro-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂)をジメチルスルホキシド中5 mMストックして作製し、次いでアッセイ緩衝液で20 mMに希釈する。微蛍光プレートのウェルあたり50 μ l基質を添加し、最終濃度を10 μ Mにすることによって、アッセイを開始する。

【0093】0時および20分間隔での蛍光(励起波長360 nm、発光波長460 nm)を読み取った。室温および3時間の典型的な時間でアッセイを行った。

【0094】次いで、ブランクおよびコラゲナーゼ含有サンプルの両方について、蛍光対時間をプロットする(3連測定によるデータを平均する)。良好なシグナル(ブランク)を示し、曲線の直線部分上にある時点(通常、約120分)を選択し、 IC_{50} 値を決定する。各濃度における各化合物に対するブランクとして0時を使用し、これらの値を120分のデータから差し引く。データを阻害剤濃度対コントロール%(阻害剤の蛍光/コラゲナーゼのみの蛍光 \times 100)としてプロットする。 IC_{50} は、コントロールの50%のシグナルを与える阻害剤の濃度から決定する。

【0095】 IC_{50} が $<0.03 \mu$ Mと報告される場合、阻害剤は0.3 μ M、0.03 μ M、0.03 μ Mおよび0.003 μ Mの濃度でアッセイする。

【0096】ゲラチナーゼ(MMP-2)の阻害
ヒトコラゲナーゼ(MMP-1)の阻害と同一の条件下で Dnp-Pro-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂ 基質(10 μ M)を使用し、ゲラチナーゼ活性の阻害をアッセイする。

【0097】1 mM APMA(P-アミノフェニル酢酸第二水銀)により4°Cで15時間、72kDゲラチナーゼを活性化し、希釈して、アッセイ時の最終濃度を100 mg/mlとする。ヒトコラゲナーゼ(MMP-1)の阻害の場合と同様に

阻害剤を希釈し、アッセイ時の最終濃度を30 μ M、3 μ M、0.3 μ Mおよび0.03 μ Mとする。それぞれの濃度を3連で行う。

【0098】0時および20分間隔で4時間、蛍光（励起波長360 nm、発光波長460 nm）を読み取った。

【0099】ヒトコラゲナーゼ（MMP-1）の阻害の場合と同様に IC_{50} を決定する。 IC_{50} が0.03 μ M未満と報告される場合、阻害剤は0.3 μ M、0.03 μ M、0.003 μ Mおよび0.0003 μ Mの最終濃度でアッセイする。

【0100】ストローメライシン活性（MMP-3）の阻害ストローメライシン活性の阻害は、WeingartenおよびFeder（Weingarten, H.およびFeder, J., 脊椎動物コラゲナーゼの分光光度測定アッセイ, Anal. Biochem. 147, 437-440 (1985)）に記載の分光光度測定アッセイの改変法に基づく。チオペプチライド基質[Ac-Pro-Leu-Gly-SCH(CH₂CH(CH₃))₂CO-Leu-Gly-OC₂H₅]の加水分解により、エルマン（Ellman）試薬の存在下でモニター可能なメルカプタンフラグメントを生じる。

【0101】26 mgのストローメライシンあたり10 mg/mlトリプシンストックを1 μ lの割合で使用し、トリプシンによりヒト組換えプロストローメライシンを活性化する。トリプシンおよびストローメライシンを37°Cで15分間インキュベートし、続いて10 μ lの10 μ g/mlダイズトリプシン阻害剤を37°Cで10分間インキュベートしてトリプシン活性を消失させた。

【0102】96ウェルマイクロリッタイタープレート上、総容量250 μ lのアッセイ緩衝液（200 mM塩化ナトリウム、50 mM MES、および10 mM塩化カルシウム、pH 6.0）中でアッセイを行う。活性化されたストローメライシンをアッセイ緩衝液で希釈し、25 μ g/mlとする。エルマン試薬（3-カルボキシー-4-ニトロフェニルジスルフィド）をジエチルホルムアミド中の1 Mストックとして作製し、1ウェルあたり50 μ lを使い緩衝液中で5 mMに希釈し、1 mMの最終濃度を得る。

【0103】阻害剤の10 mMストック溶液をジメチルスルホキシドで作製し、適切なウェルに50 μ lを添加して3 μ M、0.3 μ M、0.003 μ Mおよび0.0003 μ Mの最終濃度が得られるようにアッセイ緩衝液で系列希釈する。全ての条件は3連で行う。

【0104】ペプチド基質の300 mMジメチルスルホキシドストック溶液をアッセイ緩衝液で15 mMに希釈し、各ウェルに50 μ lを添加して3 mM基質の最終濃度を得る。ブランクは、ペプチド基質および酵素を伴わないエルマン試薬から成る。生成物の形成は、Molecular Devices UVmaxプレートリーダーを用い405 nmでモニターした。

【0105】コラゲナーゼの場合と同じ様式で IC_{50} 値を決定した。

【0106】MMP-13の阻害
2 mM APMA（P-アミノフェニル酢酸第二水銀）により37°Cで1.5時間、ヒト組換えMMP-13を活性化し、アッセイ

緩衝液（50 mM Tris, pH 7.5、200 mM塩化ナトリウム、5 mM塩化カルシウム、20 μ M塩化亜鉛、0.02% Brij）で希釈して、400 mg/mlとする。96ウェル微蛍光プレートに各ウェルに25 μ lの希釈された酵素を添加する。次いで、アッセイ時に、阻害剤および基質を添加することによって酵素を1:4の比率で希釈し、アッセイ時の最終濃度で100 mg/mlを得る。

【0107】阻害剤の10 mMストック溶液をジメチルスルホキシドで作製し、次いで、ヒトコラゲナーゼ（MMP-1）の阻害に関する阻害剤希釈スキームと同様にアッセイ緩衝液で希釈する。各濃度の25 μ lを3連で微蛍光プレートに添加する。アッセイ時の最終濃度は、30 μ M、3 μ M、0.3 μ M、および0.03 μ Mである。

【0108】ヒトコラゲナーゼ（MMP-1）の阻害の場合と同様に基質（Dnp-Pro-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂）を調製し、各ウェルに50 μ lを添加して最終アッセイ濃度を10 μ Mとする。0時および5分ごとに1時間、蛍光（励起波長360 nm；発光波長450 nm）を読み取る。

【0109】ポジティブコントロールは酵素および阻害剤を伴わない基質から成り、ブランクは、基質のみから成る。

【0110】ヒトコラゲナーゼ（MMP-1）の阻害の場合と同様に IC_{50} を決定する。 IC_{50} が0.03 μ M未満と報告される場合、阻害剤は0.3 μ M、0.03 μ M、0.003 μ Mおよび0.0003 μ Mの最終濃度でアッセイする。

【0111】コラーゲンフィルムMMP-13アッセイ
ラットI型コラーゲンは、¹⁴C無水酢酸で放射性標識し（T.E. CawstonおよびA.J. Barrett, Anal. Biochem., 99, 340-345 (1979)）、これを使用して放射性標識コラーゲンフィルムを含有する96ウェルプレートを調製する（Barbara Johnson-Wint, Anal. Biochem., 104, 175-181 (1980)）。コラゲナーゼを含有する溶液をウェルに添加すると、酵素は、巻き戻され、従って可溶化されている不溶性コラーゲンを切断する。コラゲナーゼ活性は可溶化されたコラーゲンの量に正比例し、これは、上清に放出される放射能の割合によって決定され、標準的なシンチレーションカウンターで測定される。従って、コラゲナーゼ阻害剤は、阻害剤が存在しないコントロールと比較して、放出される放射能計数を減少する化合物である。このアッセイの1つの特定の実施態様については、以下に詳細に記載する。

【0112】基質としてコラーゲンを使用し、MMP-13対MMP-1に対する化合物の選択性を決定するために、以下の方法を使用する。上記で概説した方法に従って、組換えヒトプロMMP-13またはプロMMP-1を活性化する。活性化されたMMP-13またはプロMMP-1を緩衝液（50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂、1 μ M ZnCl₂、0.05% Brij-35、0.02% アジ化ナトリウム）で0.6 μ g/mlに希釈する。

【0113】試験化合物 (10 mM) のジメチルスルホキシドストック溶液を調製する。上記のTris緩衝液中の試験化合物の希釈物を0.2、2.0、20、200、2000および20000nMにする。

【0114】100μlの適切な薬物希釈物および100μlの希釈した酵素を、¹⁴C-コラーゲンで標識したコラーゲンフィルムを含む96ウェルプレートのウェルにビペッティングする。最終酵素濃度は0.3μg/mlであり、一方、最終薬物濃度は0.1、1.0、10、100、1000 nMである。それぞれの薬物濃度およびコントロールを3連で分析する。酵素が存在しない条件および任意の化合物が存在しない酵素についても3連のコントロールを測定する。

【0115】プレートを、利用可能なコラーゲンの約30～50%が可溶化されるような期間 (様々な時点で異なるコントロールウェルを計数することによって決定される) だけ、37°Cでインキュベートする。ほとんどの場合、約9時間のインキュベーションが必要である。アッセイが十分に進行した場合、それぞれのウェルの上清を取り出し、シンチレーションカウンターで計数する。それぞれのサンプルからバックグランド計数 (酵素を含まないウェル中の数により決定する) を差し引き、酵素のみを有し、阻害剤を有さないウェルと比較して放出%を算出する。各点の3連の値を平均し、放出%対薬物濃度としてデータをグラフ化する。放射性標識したコラーゲンの放出の50%阻害が得られる点からIC₅₀を決定する。

【0116】軟骨馴化培地中の活性コラーゲナーゼの同一性を決定するために、基質としてコラーゲン、コラーゲナーゼ活性を含有する軟骨馴化培地および様々な選択性の阻害剤を使用してアッセイを行った。コラーゲンの分解 (コラーゲン破壊の原因であるコラーゲナーゼを表す) が生じた間軟骨馴化培地を回収した。組換えMMP-13または組換えMMP-1を使用する代わりに軟骨馴化培地が酵素の供給源であったことを除き、上記で概説した通りにアッセイを行った。

【0117】ウシ鼻軟骨からのIL-1誘導性軟骨コラーゲン分解

このアッセイでは、IL-1誘導性プロテオグリカン分解またはIL-1誘導性コラーゲン分解のいずれかを阻害する様々な化合物の有効性を試験するために一般に使用されるウシ鼻軟骨外植片を使用する。ウシ鼻軟骨は、関節軟骨、即ち、主にII型コラーゲンおよびアグリカンであるマトリックスによって囲まれた軟骨細胞に極めて類似する組織である。この組織は、(1) 関節軟骨に極めて類似する、(2) 容易に入手することができる、(3) 比較的均一である、および(4) IL-1刺激後に予想可能な速度論で分解するため、該組織を使用する。

【0118】化合物をアッセイするためにこのアッセイの2つの変型が使用されている。両変型により類似のデータが得られる。2つの変型を以下に記載する。

【0119】変型1

ウシ鼻軟骨の3つの栓子 (直径約2mm×長さ1.5 mm) を24ウェル組織培養プレートのそれぞれのウェルに配置する。次いで、1mlの無血清培地をそれぞれのウェルに添加する。DMSO中の10 mMストック溶液として化合物を調製し、次いで、無血清培地で適切に希釈し、最終濃度を例えば、50、500および5000 nMとする。それぞれの濃度を3連でアッセイする。

【0120】ヒト組換えIL-1α (5ng/ml) (IL-1) を3連のコントロールウェルおよび薬物を含有するそれぞれのウェルに添加する。薬物およびIL-1のいずれも添加していない3連のコントロールウェルも設定する。培地を取り出し、6、12、18および24日目または必要であれば3～4日ごとにIL-1および適切な薬物濃度を含有する新鮮培地を添加する。各時点で取り出した培地を、後の分析のために-20°Cで保存する。IL-1のみのウェル中の軟骨がほぼ完全に再吸収している (約21日目) 場合、実験を終了する。培地を取り出し、保存する。各時点でのそれぞれのウェルからアリコート (100μl) をプールし、パパインで消化し、次いでヒドロキシプロリン含有量について分析する。バックグランドのヒドロキシプロリン (IL-1および薬物のいずれも有さないウェルの平均) を各データポイントから差し引き、それぞれの3連から平均を算出する。次いで、IL-1のみの平均値の%としてデータを表し、プロットする。このプロットからIC₅₀を決定する。

【0121】変型2

実験の設定は、12日目まで上記で概説した変型1と同一である。12日目、各ウェルから馴化培地を取り出し、凍結する。次いで、0.5μg/mlトリプシンを含有する1mlのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を各ウェルに添加し、37°Cでさらに48時間インキュベーションを継続する。48時間のトリプシン中でのインキュベーション後、PBS溶液を取り出す。PBS/トリプシン溶液のアリコート (50μl) および先の2つの時点 (6および12日目) をプールし、加水分解しヒドロキシプロリン含有量を決定する。バックグランドのヒドロキシプロリン (IL-1および薬物のいずれも有さないウェルの平均) を各データポイントから差し引き、それぞれの3連から平均を算出する。次いで、IL-1のみの平均値の%としてデータを表し、プロットする。このプロットからIC₅₀を決定する。この変型では、実験の時間経過はかなり短縮される。IL-1刺激の12日後48時間トリプシンを添加すると、コラーゲナーゼ活性によって損傷を受けているが、まだ軟骨マトリックスから放出されていない任意のII型コラーゲンを放出するようである。IL-1刺激がない場合は、トリプシン処理により軟骨外植片において低いバックグランドレベルのコラーゲン分解のみが生じる。

【0122】ヒト92 kDゲラチナーゼ (MMP-9) の阻害ヒトコラーゲナーゼ (MMP-1) の阻害について上記の条件に類似の条件下で、Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH

基質 (10 μ M) を使用して、92 kD ゲラチナーゼ (MMP-9) の活性の阻害をアッセイする。

【0123】1 mM P-アミノフェニル酢酸第二水銀 (新たに調製された0.2 N NaOH中100 mMストック由来) により37°Cで2時間、ヒト組換え92 kDゲラチナーゼ (MMP-9、ゲラチナーゼB) を活性化する。

【0124】阻害剤の10 mMジメチルスルホキシドストック溶液を、以下のスキームを使用し、アッセイ緩衝液 (50 mM TRIS, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 μ M ZnCl₂, 0.02% Brij-35 (体積/体積)) 中で系列希釈する。

10 mM \rightarrow 120 μ M \rightarrow 12 μ M \rightarrow 1.2 μ M \rightarrow 0.12 μ M

【0125】必要であれば、これと同じスキームに従ってさらに希釈を行う。各アッセイにおいて、それぞれの化合物について最低でも4つの阻害剤濃度を実施する。次いで、25 μ Lの各濃度を、3連でブラック96ウェル丸底微蛍光プレートのウェルに添加する。最終アッセイ容量が100 μ Lであるため、阻害剤の最終濃度はさらなる1:4希釈の結果 (即ち、30 μ M \rightarrow 3 μ M \rightarrow 0.3 μ M \rightarrow 0.03 μ Mなど) である。ブランク (酵素なし、阻害剤なし) およびポジティブ酵素コントロール (酵素あり、阻害剤なし) も3連で調製する。

【0126】活性化された酵素をアッセイ緩衝液で100 ng/mLに希釈する。ウェルあたり25 μ Lをマイクロプレートの適切なウェルに添加する。アッセイ時のコラゲナーゼの最終濃度は25 ng/mL (0.27 nM) である。

【0127】基質 (Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) の5 mMジメチルスルホキシドストック溶液をアッセイ緩衝液で20 μ Mに希釈する。50 μ Lの希釈した基質を添加し、最終アッセイ濃度の10 μ M基質を得ることに、アッセイを開始する。0時での蛍光 (励起波長

320 nm、発光波長390 nm) を直ちに読み取り、続いて、90単位での増幅度を伴うPerSeptive Biosystems CytoFluor Multi-Wellプレートリーダーにて室温で15分ごとに読み取る。

【0128】酵素およびブランクの蛍光の平均値を対時間でプロットする。IC₅₀を決定するために、この曲線の直線部分上にある初期の時点を選択する。各希釈における各化合物に対する0時点をその後の時点から差し引き、次いでデータを酵素コントロールの% (阻害剤の蛍光/ポジティブ酵素コントロールの蛍光 \times 100) として表す。データを阻害物質濃度対酵素コントロールの%としてプロットする。IC₅₀は、ポジティブ酵素コントロールの50%のシグナルを与える阻害剤の濃度として規定する。

【0129】アグリカナーゼアッセイ
関節軟骨由来の1次ブタ軟骨細胞を、連続トリプシンおよびコラゲナーゼ消化、続く1晩のコラゲナーゼ消化により単離し、ウェルあたり2 \times 10⁵細胞で、I型コラーゲン被覆プレート中に5 μ Ci/mL ³⁵S (1000 Ci/mmol) イオウを有する48ウェルプレートに配置する。5%CO₂の大気圧下、37°Cで (約1週間) 細胞のプロテオグリカンマトリックスに標識物を取り込ませる。

【0130】アッセイ開始の前夜、軟骨細胞単層をDMEM/1%PSF/Gで2回洗浄し、次いで、新鮮DMEM/1%FBS中で1晩インキュベートする。

【0131】翌朝、軟骨細胞をDMEM/1%PSF/Gで1回洗浄する。最後の洗浄はインキュベータ内のプレート上で行う一方、希釈を行う。

【0132】培地および希釈物は、以下の表に記載のように作製することができる。

【0133】

【表1】

コントロール培地	DMEMのみ (コントロール培地)
IL-1 培地	DMEM+IL-1 (5 ng/ml)
薬物の希釈	<p>全ての化合物ストックを DMSO 中 10 mM で作製する。96 ウェルプレート中、DMEM にて各化合物の 100 μM ストックを作製する。冷凍室で1晩保存する。</p> <p>翌日、IL-1 を DMEM で 5 μM、500nM、および 50nM の系列希釈を作製する。</p> <p>最後の洗浄液をウェルから吸引し、上記の希釈物から得られる 50 μL の化合物を、48 ウェルプレートの適切なウェル内の 450 μL の IL-1 培地に添加する。</p> <p>最終化合物濃度は 500 nM、50 nM、および 5 nM に等しい。全てのサンプルは3連で行い、各プレート上にコントロールおよび IL-1 のみのサンプルを伴う。</p>

【0134】プレートを標識し、プレートの内部の24ウェルのみを使用する。1つのプレート上で、いくつかのカラムをIL-1 (薬物なし) およびコントロール (IL-1なし、薬物なし) とする。これらのコントロールカラムを周期的に計数して35Sプロテオグリカン放出をモニターする。コントロールおよびIL-1培地をウェルに添加 (450 μ L) し、続いて化合物 (50 μ L) を添加してアッセイを開始する。プレートを5%CO₂大気圧下、37°Cで

インキュベートする。

【0135】培地サンプルの液体シンチレーションの計数 (LSC) によって評価される40~50%放出 (IL-1培地由来のCPMが、コントロール培地の4~5倍である場合) で、アッセイを終了する (9~12時間)。培地を全てのウェルから取り出し、シンチレーションチューブに配置する。シンチレート (scintillate) を添加し、放射能計数を獲得する (LSC)。細胞層を可溶化するため

に、500 μ lのパパイン消化緩衝液(0.2M Tris, pH 7.0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT、および1 mg/mlパパイン)を各ウェルに添加する。消化溶液を有するプレートに60°Cで1晩インキュベートする。翌日、細胞層をプレートから取り出し、シンチレーションチューブに配置する。次いで、シンチレートを添加し、サンプルを計数する(LSC)。

【0136】各ウェルに存在する全体から放出された計数の%を決定する。各ウェルからコントロールのバックグラウンドを差し引き、3連の平均を求める。化合物阻害の%は、0%阻害としてのIL-1サンプル(100%の全計数)に基づく。

【0137】試験した本発明の化合物は1 μ M未満、好ましくは上記のアッセイのうちの少なくとも1つにおいて50 nM未満のIC₅₀を有する。本発明の化合物はまた、1以上のレプロライシンまたはMMPに対して特異な活性を有する(即ち、1以上のレプロライシンまたはMMPに対して選択的である)。本明細書で使用する選択性は、2つ以上の上記のプロトコルから得られるIC₅₀阻害結果の割合を指す。選択的である本発明の化合物は、少なくとも10の割合を有する。所望の効力または選択性を有する本発明の化合物は、上記のプロトコルに従って、化合物(好ましくは小さな分子、より好ましくはヒドロキサム酸、最も好ましくは式Iで表される化合物)をアッセイし、IC₅₀および選択性の割合を決定することによって、同定することができる。

【0138】本発明の方法によって同定され得る好ましい化合物の1つの群(より好ましくは式Iで表される化合物)は、MMP-1よりもMMP-13に対して少なくとも10倍、好ましくは40倍高い選択性で、MMP-1よりもMMP-13に対する選択的活性(好ましくは500nM、より好ましくは100nM、最も好ましくは50nM未満のIC₅₀)を有する阻害剤を含む本発明の方法によって同定することができる。

【0139】化合物の調製

以下の実施例は、本発明の化合物の調製について例示している。融点は未補正である。NMRのデータは百万あたりの部(δ)で報告する。市販の試薬はさらなる精製を行うことなく利用した。クロマトグラフィーは、32~63 mmシリカゲルを使用して実施され、窒素圧(フラッシュクロマトグラフィー)条件下で行われるカラムクロマトグラフィーを指す。室温または環境温度とは20~25°Cを指す。簡便および収量を最大にするために、窒素大気圧下で全ての非水性反応を行った。

【0140】実施例1

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキサミド

a) (4R)-3-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-1, 5-ジ

カルボン酸1-ベンジルエステル5-tert-ブチルエステル

(4R)-オキソイミダゾリジン-1, 5-ジカルボン酸1-ベンジルエステル5-tert-ブチルエステル(650 mg, 2.0 mmol)のアセトン(10 mL)溶液に粉末化したK₂CO₃(550 mg)および4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジルブロミド(1.85 g, 6.6 mmol)を添加した。反応混合物を室温で6日間攪拌し、次いで溶媒をエバポレートした。残渣を酢酸エチル中に採り、水および塩水で洗浄した。MgSO₄上で乾燥後、溶媒をエバポレートした。クロロホルムにて溶出するシリカゲル上のクロマトグラフィーによって、残渣から題目の化合物(820 mg, 78%)を単離した。

【0141】b) (4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸-tert-ブチルエステル(4R)-3-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-1, 5-ジカルボン酸1-ベンジルエステル5-tert-ブチルエステル(1.1 g, 2.1 mmol)のメタノール(100 mL)溶液を、炭素(110 mg)上10%Pdで3気圧6時間、水素化した。0.45 μ m孔ナイロンフィルターを介する濾過により触媒を除いた後、溶媒をエバポレートし、黄色固体として題目の化合物(810 mg, 100%)を得た。

【0142】c) (4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸-tert-ブチルエステル(810 mg, 1.56 mmol)のCH₂Cl₂(8 mL)溶液をトリフルオロ酢酸(8 mL)で処理した。反応混合物を室温で2.5時間攪拌し、濃縮してオイルを残した。温ジエチルエーテルおよびヘキサンの混合物でオイルを粉砕後、濾過により題目の化合物である白色固体(297 mg, 58%)を回収した。

【0143】d) (4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸(2-トリメチルシリルエトキシ)アミド

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸(120 mg, 0.36 mmol)の塩化メチレン(5 mL)溶液に連続的に1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(73 mg, 0.54 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン(0.13 mL, 0.75 mmol)、O-(2-トリメチルシリルエチル)ヒドロキシルアミン塩酸(92 mg, 0.54 mmol)および1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸(104 mg, 0.54 mmol)を添加した。反応混合物を室温で16時間攪拌し、次いで、塩化メチレンおよび水で希釈した。有機相を連続的に1M HCl水溶

液、水、 NaHCO_3 飽和水溶液および塩水で洗浄した。 MgSO_4 上で乾燥後、溶液を濃縮してオイルにした。酢酸エチルにより溶出するシリカゲル上でのクロマトグラフィーにより、題目の化合物であるオイル (85 mg, 53%) を単離した。

【0144】e) (4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド

(4R)-1-[4-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸(2-トリメチルシリルエトキシ)アミド (85mg, 0.19mmol) の塩化メチレン (5 mL) 溶液に三フッ化ホウ素エーテラート (0.073 mL, 0.58 mmol) を添加した。反応混合物を室温で1.5時間攪拌し、次いで NH_4Cl 飽和水溶液を添加することにより抑制した。混合物を水および酢酸エチルで希釈し、有機相を塩水で洗浄し、 MgSO_4 上で乾燥し、濃縮して白色固体とした。題目の化合物 (31 mg, 47%) を、酢酸エチルおよびメタノールの混合物からの再結晶により単離した。

【0145】 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 10.63 (br s, 1 H), 8.93 (br s, 1 H), 7.23-7.17 (m, 4 H), 7.05-7.01 (m, 2 H), 6.92 (d, $J=8.7$ Hz, 2 H), 6.76 (s, 1 H), 4.22 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 3.92-3.89 (m, 1 H), 3.40 (apparent t, $J=9.1$ Hz, 1 H), 3.15-3.12 (m, 1 H). MS m/z 344 (M-1). $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}_4$ に対して算出された分析: C, 59.13; H, 4.67; 12.17. Found: C, 58.98; H, 4.83; N, 12.10.

【0146】実施例2

(4R)-1-[4-(4-ナフタレン-1-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド

MS m/z 376 (M-1). $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ に対して算出された分析: C, 66.83; H, 5.07; N, 11.13. Found: C, 66.75; H, 5.30; N, 11.13.

【0147】実施例3

(4R)-1-[4-(ナフタレン-2-イルオキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド

MS m/z 376 (M-1). $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4 + 0.5 \text{H}_2\text{O}$ に対して算出された分析: C, 65.28; H, 5.22; N, 10.87. Found: C, 65.01; H, 5.12; N, 11.28.

【0148】実施例4

(4R)-1-(4-メトキシベンジル)-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド
M.p. 130-133°C. MS m/z 264 (M-1). $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$ に対して算出された分析: C, 54.33; H, 5.70; 15.84. Found: C, 54.24; H, 51.77; N, 15.62.

【0149】実施例5

(4R)-1-[3-(4-フルオロフェノキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド

MS m/z 344 (M-1). $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}_4$ に対して算出された分析: C, 59.13; H, 4.67; 12.17. Found: C, 59.24; H, 4.60; N, 12.42.

【0150】実施例6

(4R)-1-ナフタレン-2-イルメチル-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド
MS m/z 284 (M-1). $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$ に対して算出された分析: C, 63.15; H, 5.30; 14.73. Found: C, 62.82; H, 5.32; N, 14.49.

【0151】実施例7

(4R)-1-(4'-フルオロビフェニル-4-イルメチル)-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド

MS m/z 328 (M-1). $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}_3 + 0.5 \text{H}_2\text{O}$ に対して算出された分析: C, 60.35; H, 5.06; 12.42. Found: C, 60.43; H, 4.99; N, 12.83.

【0152】実施例8

(4R)-1-(4-ベンジルオキシベンジル)-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド

MS m/z 340 (M-1). $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ に対して算出された分析: C, 63.33; H, 5.61; 12.31. Found: C, 63.13; H, 5.62; N, 12.28.

【0153】実施例9

(4R)-1-[4-(2-クロロ-4-フルオロベンジルオキシ)ベンジル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド

MS m/z 392 (M-1). $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_4 + 0.5 \text{H}_2\text{O}$ に対して算出された分析: C, 53.67; H, 4.50; 10.43. Found: C, 53.78; H, 4.51; N, 10.15.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

(参考)

A 6 1 P 1/04
3/10
7/00
9/04

A 6 1 P 1/04
3/10
7/00
9/04

9/10		9/10	
	1 0 1		1 0 1
9/14		9/14	
11/00		11/00	
17/00		17/00	
17/02		17/02	
19/02		19/02	
19/10		19/10	
25/00		25/00	
25/02		25/02	
25/04		25/04	
25/06		25/06	
25/14		25/14	
25/16		25/16	
25/24		25/24	
25/28		25/28	
27/02		27/02	
29/00		29/00	
31/04		31/04	
31/18		31/18	
35/00		35/00	
37/02		37/02	
37/08		37/08	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1

(72)発明者 ラルフ ペルトン ロビンソン ジュニア
アメリカ合衆国 06340 コネチカット州
グロトン市 イースタン・ポイント・ロ
ード (番地なし) ファイザー・グロー
バル・リサーチ・アンド・デベロップメン
ト内